

转录因子 GRHL3 抑制 SNX16 表达促进 乳腺癌细胞迁移和侵袭

周利利^{1,2}, 曾凡军¹, 涂珍珍¹, 郭立钰¹, 郭思佳¹, 邓庆梅³, 周海胜^{1,2}

摘要 目的 研究转录因子 GRHL3 参与调控分选连接蛋白 16(SNX16) 表达的分子机制及其对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响。方法 免疫组织化学检测乳腺癌组织和癌旁组织中 GRHL3 和 SNX16 的表达变化; 通过建立过量表达 GRHL3 的乳腺癌细胞 MCF7, Western blot 检测 GRHL3、SNX16 在 MCF7 细胞中表达变化; 利用分子克隆技术构建含有 SNX16 基因启动子和突变的 SNX16 基因启动子的荧光素酶报告基因表达载体, 通过检测荧光素酶活性变化观察 GRHL3 对 SNX16 基因启动子的调控作用; 利用 Transwell 迁移和侵袭实验检测 GRHL3 过量表达的 MCF7 细胞迁移和侵袭能力的影响, 并通过转染 SNX16 cDNA 的表达载体回补 SNX16 表达, 观察 MCF7 细胞的迁移和侵袭能力变化。结果

免疫组织化学结果显示: 与癌旁组织相比, 乳腺癌组织中 GRHL3 高水平表达, 而 SNX16 的表达水平较低; Western blot 结果显示, 过量表达 GRHL3 的 MCF7, SNX16 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 通过分子克隆技术成功构建 SNX16 基因启动子和突变的 SNX16 基因启动子的荧光素酶报告基因表达载体; 荧光素酶活性检测实验结果显示 GRHL3 对荧光素酶报告基因 SNX16 启动子具有显著抑制作用, 突变后 GRHL3 结合位点, GRHL3 对 SNX16 基因启动子的负调控作用消失; Transwell 迁移和侵袭实验结果说明过表达 GRHL3 的 MCF7 细胞侵袭和迁移能力显著增强, 回补 SNX16 后, MCF7 细胞侵袭和迁移能力明显减弱。结论 在乳腺癌细胞中, 转录因子 GRHL3 对 SNX16 的启动子具有负调控作用, GRHL3 通过结合 SNX16 基因启动子抑制 SNX16 表达, 促进细胞的迁移和侵袭。

关键词 GRHL3; SNX16; 乳腺癌; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 319; R 758.69

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)03-0391-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.011

转录因子 GRHL3 作为 Grainyhead 家族成员之

2018-12-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81372911)

作者单位: ¹ 安徽医科大学生物化学教研室, 合肥 230032

² 皮肤病学国家重点实验室培育基地, 合肥 230032

³ 中国科学院合肥肿瘤医院检验科, 合肥 230031

作者简介: 周利利, 男, 硕士研究生;

周海胜, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

一 在胚胎发育过程中, 参与调控上皮细胞的分化和迁移^[1-2]。GRHL3 基因敲除小鼠因神经管闭合缺陷和皮肤表皮屏障缺少而致死^[3-4]。对于 GRHL3 调控肿瘤细胞发生迁移和侵袭的靶基因, 目前报道较少。分选连接蛋白 16(Sorting Nexin 16, SNX16) 属于 SNXs 蛋白家族成员, 分布于胞外基质连接的粘着斑。过去研究^[5]显示增加 SNX16 的表达能够抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭, 其机制是与 SNX16 调控 E-cadherin 的回收再利用有关。

为证实 SNX16 是 GRHL3 调控的靶基因并研究其对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响, 拟利用免疫组织化学方法分析 GRHL3 和 SNX16 在乳腺癌组织中表达关系; 利用低侵袭能力的乳腺癌细胞株 MCF7, 过量表达 GRHL3 后分析 SNX16 的表达变化及 MCF7 细胞迁移和侵袭变化, 初步探讨 GRHL3 调控 SNX16 表达的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 人乳腺癌组织标本由中国科学院合肥肿瘤医院及达安医学检验中心病理科提供, 其中乳腺侵袭性导管癌标本 18 例, 乳腺侵袭性导管癌癌旁组织标本 10 例, 正常乳腺组织标本 2 例。

1.1.2 细胞系 人乳腺癌细胞系 MCF7 和人胚胎肾细胞系 293T 由海胜实验室保存; 稳定过量表达 GRHL3 的 MCF7 细胞系由海胜实验室构建。

1.1.3 载体 真核细胞表达载体 pCMV-Tag-2B、用于检测启动子活性的荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic、海肾萤光素酶报告基因载体 pRL-TK 载体购自美国 Promega 公司; 克隆载体 pMD-48T 购自大连宝生物有限公司; 过量表达 GRHL3 的表达载体 pC-MV-GRHL3、过量表达 SNX16 的表达载体 pCMV-SNX16 由海胜实验室构建。

1.1.4 引物 用于 PCR 扩增人的 SNX16 基因启动子 DNA 引物: P1: 5'-AGAGAATGTCGATTTCTCCTGC-CA-3', P2: 5'-TTAACCGCAGCTTTTCGCCT-3'; 用于对 GRHL3 第一个结合位点(Site 1) 进行定点突变的

PCR 引物 Prom1: 5'-AGAGAATGTTCGAcgaactCTGC-CA-3' ,用于对 GRHL3 第二个结合位点(Site 2) 定点突变的 PCR 引物 Prom2: 5'-AGAGACTatctgattCGGG-GAGCAGCTGCT-3'。Prom1 和 Prom2 的序列中小写字母为突变位点序列。

1.1.5 主要试剂 RPMI-1640 培养基、高糖 DMEM 培养基和青霉素/链霉素(P/S) 来自美国 Hyclon 公司; 胎牛血清(FBS) 购自美国 Corning 公司; 转染细胞试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司; 兔源抗 SNX16 抗体购自美国 Novus Biologicals 公司, 鼠源抗 GAPDH 抗体和辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase ,HRP) 标记的二抗购自美国 Santa Cruz 公司; 免疫组化二抗和免疫组化 DAB 显色剂试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; BD 基质胶和 Boyden 小室购于美国 BD Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCF7 细胞使用含 10% 胎牛血清和含 1% 的 P/S 的 RPMI-1640 培养基。细胞放置于 37 °C 并含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 SNX16 基因启动子克隆和定点突变 通过 PCR 克隆野生型的 SNX16 基因启动子 -417 bp 到 +105 bp DNA 片段, 并插入 pMD-18T 载体测序。利用 KpnI 和 XhoI 双酶切将 SNX16 启动子亚克隆到 pGL3-Basic 载体上, 构建 pGL3-SNX16 Promoter-Luc 重组载体; 利用突变引物按如下条件进行 PCR 扩增: 94 °C、2 min、98 °C、10 s、60 °C、30 s、68 °C、3 min; 用 DpnI 消化模板质粒 DNA。用 T4 多聚核苷酸激酶和 DNA 连接酶处理 PCR 产物, 以进行自身环化。环化 DNA 转化感受态细菌, 提取单个细菌克隆的质粒 DNA 进行测序。

1.2.3 荧光素酶实验 将 pGL3-Basic 载体、重组载体 pGL3-SNX16 Promoter-Luc 以及 3 种突变载体与 pRL-TK 和 pCMV-GRHL3 重组载体(或 pCMV-Tag-2B 空载体) 按照 Lipofectamine 3000 试剂说明书操作, 共同转染 239T 细胞, 24 h 后收集样品进行荧光素酶活性检测。

1.2.4 Western blot 实验 根据文献^[6]方法, 收集细胞总蛋白, 进行聚丙烯酰胺-SDS 电泳, 待目的蛋白充分分离至不同位置后转移至 PVDF 膜上, 室温封闭 45 min, 4 °C 过夜孵育一抗(1 : 1 000)。HRP 标记的二抗 室温孵育 6 ~ 8 h, 加入超敏底物溶液, 暗室中显影和定影, 拍照。

1.2.5 Transwell 迁移实验和侵袭实验 细胞侵袭实验将融化 BD 基质胶加入 Transwell 小室上层, 晾

干 静置过夜; 细胞计数调整为 2.0 × 10⁵ /ml, 取 200 μl 加至上室, 下室加 600 μl 5% FBS 培养基; 甲醇固定 20 min, 苏木精染色 10 min, 洗涤, 伊红染色 2 min, 冲洗后擦去上层细胞, 制片, 计数。细胞迁移实验过程与细胞侵袭实验相同, 但在小室上层不添加 BD 基质胶。

1.2.6 免疫组化 组织切片(4 μm) 常规脱蜡入水后, 微波热修复抗原, 使用 3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶, 山羊血清封闭, 4 °C 孵育一抗(1 : 100) 过夜。第 2 天依次室温孵育通用二抗工作液聚合物, DAB 显色, 苏木精复染, 最后组织经脱水透明后烘干封片。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数比较采用 t 检验, 多组均数比较采用单因素方差分析, 多组均数间两两比较采用 SNK 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测 GRHL3、SNX16 在乳腺癌组织表达 免疫组化结果显示, GRHL3 主要在乳腺癌组织的细胞核表达, 胞质亦可见 GRHL3 染色; SNX16 分布于正常乳腺组织导管上皮细胞质, 而乳腺癌组织 SNX16 表达水平较低或不表达(图 1)。18 例癌组织标本中, 14 例(77.8%) 显示 GRHL3(+)、SNX16(-), 10 例癌旁组织有 8 例显示 GRHL3(+)、SNX16(-); 只有 2 例(11.1%) 癌组织标本与正常乳腺组织均显示为 GRHL3(-)、SNX16(+)(表 1)。

表 1 GRHL3 和 SNX16 在乳腺癌组织和癌旁组织表达分析 [n(%)]

组织	GRHL3/SNX16			
	+ / -	- / +	+ / +	- / -
乳腺癌	14(77.8)	2(11.1)	1(5.6)	1(5.6)
癌旁组织	8(80.0)	2(20.0)	0	0

2.2 MCF7 细胞 GRHL3 和 SNX16 的表达变化 为了在细胞水平证实 GRHL3 与 SNX16 的负调控作用, 选择低侵袭力的乳腺癌细胞株 MCF7 作为研究对象, 建立稳定过量表达 GRHL3 的乳腺癌细胞株。将 pCMV-GRHL3 及其对应空载体 pCMV-Tag-2B 分别转染 MCF7 细胞。通过 G418 筛选分别获得过量表达 GRHL3 的 MCF7/GRHL3 细胞克隆和对照细胞克隆 MCF7/空载体。Western blot 检测结果显示:

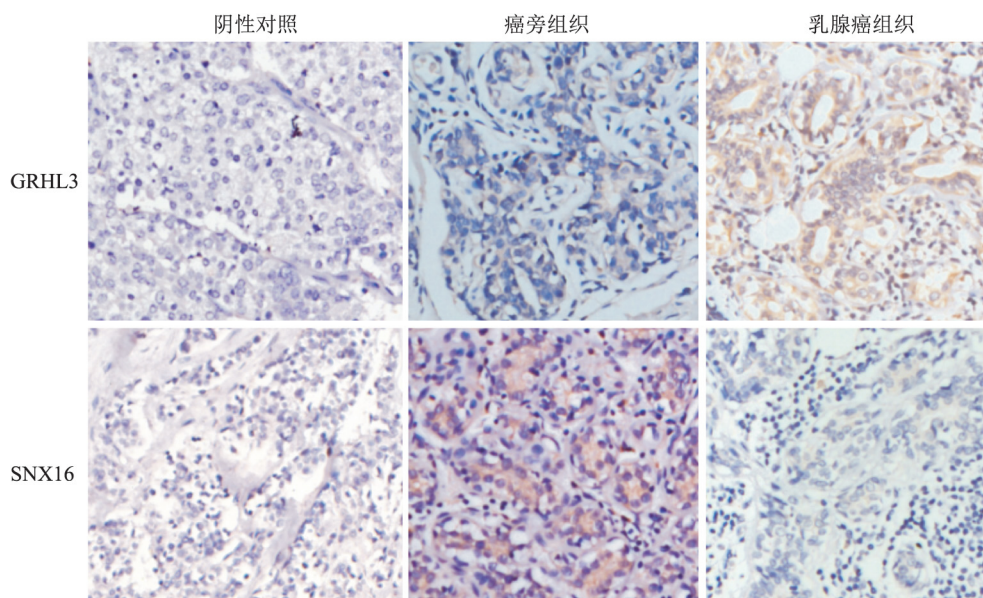


图1 IHC检测乳腺组织中GRHL3和SNX16表达 ×200

MCF7/GRHL3 细胞 GRHL3 的表达较对照 MCF7/空载体细胞显著增加,而 SNX16 的表达明显降低(图 2A);与对照组 MCF7/空载体细胞相比,MCF7/GRHL3 细胞的 GRHL3 ($P = 0.022$) 和 SNX16 ($P = 0.002$) 的表达变化均具有统计学意义(图 2B)。可见,GRHL3 和 SNX16 的表达变化与乳腺癌组织表达变化一致。

2.3 GRHL3 抑制 SNX16 基因启动子活性分析 已知 GRHL3 与靶基因启动子区域 DNA 特异序列 TTTCC(T) 或 GGCT(A)GAGG 结合(图 3A),抑制靶基因表达。通过生物信息学分析 SNX16 基因启动子 DNA,发现 SNX16 基因启动子区有 2 个 GRHL3 潜在结合位点:一号位点(Site 1) -408 ~ -403 bp 存在 TTTCC(T);二号位点(Site 2) +16 ~ +23 bp 存在 GGCT(A)GAGG(图 3B)。利用 MCF7 细胞基因组 DNA 为模板,PCR 扩增获得 SNX16 基因启动子 DNA (513 bp),并亚克隆至 pGL3-Basic,构建重组载体 pGL3-SNX16 Promoter-Luc;利用 PCR 方法对一号位点和二号位点分别或同时进行定点突变。测序结果证实成功构建重组载体 pGL3-SNX16 Promoter-Luc 并实现定点突变(图 3C)。从而构建含有 3 种突变的 SNX16 启动子荧光素酶报告基因的重组载体:一号位点突变的 pGL3-SNX16 Promoter-Luc/m1、二号位点突变的 pGL3-SNX16 Promoter-Luc/m2 和两位点突变 pGL3-SNX16 Promoter-Luc/m1 + 2。

为了探讨 GRHL3 对 SNX16 基因启动子的调控作用,将 pGL3-SNX16 Promoter-Luc 重组载体及 3 个

突变的载体联合 pRL-TK 分别与 pCMV-GRHL3(或 pCMV-Tag-2B)共转染 293T 细胞。24 h 后检测各组相对荧光强度。结果显示:GRHL3 对野生型 SNX16 基因启动子有明显的抑制作用($F = 78.43$ $P = 0.001$);

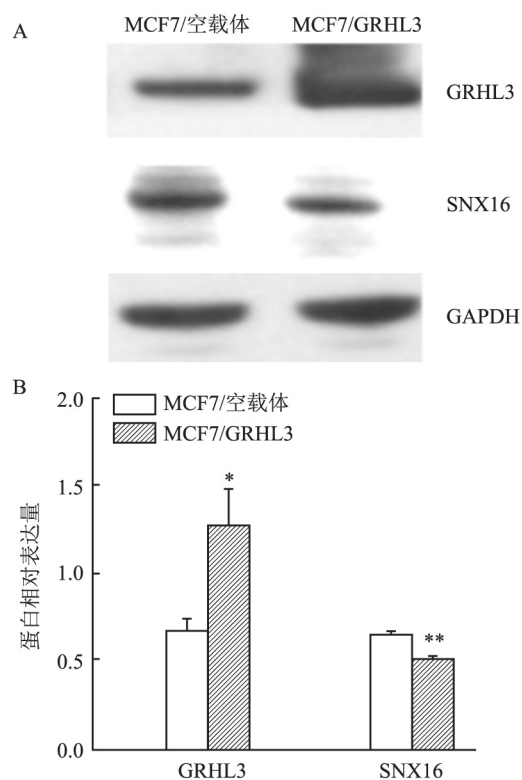


图2 MCF7细胞过量表达GRHL3抑制SNX16表达

A: MCF7 细胞 GRHL3 和 SNX16 的表达; B: GAPDH 作为内参,GRHL3 和 SNX16 相对定量分析;与 MCF7/空载体比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

一号位点 ($F = 17.13, P = 0.014$)、二号位点 ($F = 73.34, P = 0.001$) 单突变的 SNX16 基因启动子在 GRHL3 作用下, 仍然具有明显抑制作用; 当一号位点与二号位点同时突变后, GRHL3 没有显示 SNX16 基因启动子的抑制作用, 无统计学意义 ($F = 3.09, P = 0.153$) (图 4)。

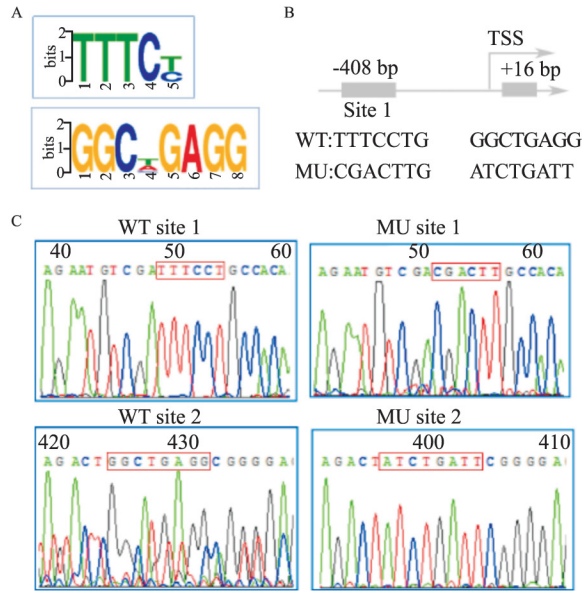


图 3 GRHL3 结合 DNA 序列分析和 SNX16 基因启动子 GRHL3 结合位点突变

A: GRHL3 潜在结合位点的 DNA 序列; B: SNX16 基因启动子区域 GRHL3 结合位点位置和 DNA 序列; C: SNX16 基因启动子 GRHL3 结合位点 DNA 序列和突变的 DNA 测序; WT: 野生型启动子; MU: 突变 GRHL3 结合位点的 DNA 序列

2.4 GRHL3 对细胞迁移和侵袭能力的影响 为了研究过量表达 GRHL3 抑制 SNX16 表达可能影响乳腺癌细胞迁移和侵袭能力, 通过瞬时转染 pCMV-SNX16 以回补 SNX16 的表达, 进而进行 Transwell 细胞迁移和细胞侵袭实验。建立转染空表达载体的细胞系 MCF7/空载体; 转染过量表达 GRHL3 的细胞系 MCF7/GRHL3; 共转染过量表达 GRHL3 和 SNX16 的细胞 MCF7/GRHL3 + SNX16。Transwell 迁移实验结果显示: 转染空载体 MCF7 细胞的迁移细胞数为 (13.3 ± 2.07), GRHL3 过表达 MCF7 细胞的迁移细胞均数 (93.17 ± 9.56), MCF7/GRHL3 细胞在瞬时转染 pCMV-SNX16 以回补 SNX16 的表达, 发生迁移的细胞数为 (20.50 ± 4.18)。经单因素方差分析三组间迁移能力, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。转染空载体的 MCF7 对照细胞与回补 SNX16 表达的 MCF7/GRHL3 细胞相比, 迁移细胞数无统计学意义 ($P = 0.184$) (图 5)。

Transwell 侵袭实验结果显示: 转染空载体的 MCF7 细胞发生侵袭细胞数为 (10.83 ± 1.72), 过表达 GRHL3 的 MCF7 细胞发生侵袭细胞数为 (31.67 ± 4.37), 过量表达 GRHL3 的 MCF7/GRHL3 细胞转染 pCMV-SNX16 后, 发生侵袭的细胞数为 (5.50 ± 2.26)。经单因素方差分析三组间侵袭能力, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。其中过量表达 GRHL3 的 MCF7 细胞迁移能力最强, 转染空载体的 MCF7 细胞迁移细胞数明显低于与过量表达 GRHL3 并回补 SNX16 的 MCF7 细胞侵袭细胞数, 差异有统计学

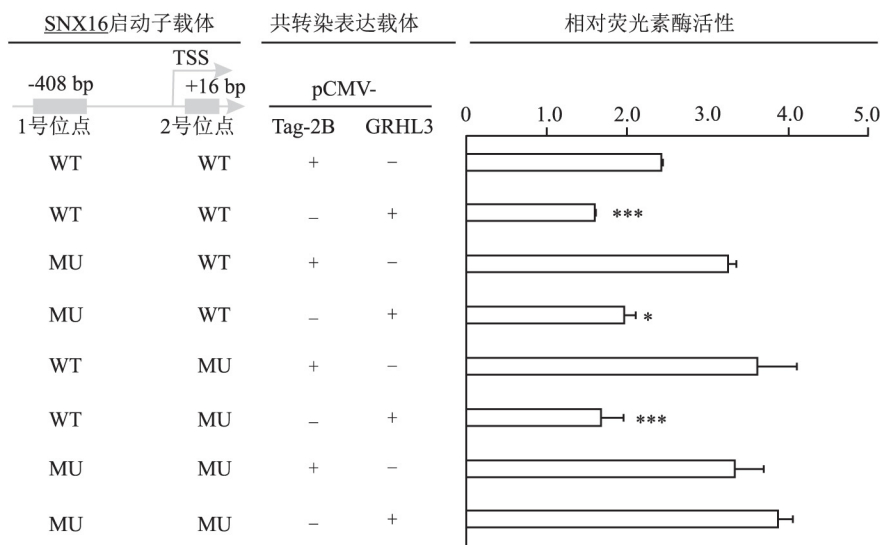


图 4 GRHL3 调节 SNX16 基因启动子活性分析

TSS: 转录起始点; pCMV-Tag-2B: 空表达载体; pCMV-GRHL3: 过量表达 GRHL3 的表达载体; WT: 野生型启动子; MU: 突变 1 号和(或 2 号)位点的 SNX16 基因启动子; 与共转染空表达载体的细胞相比: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

意义($P = 0.023$) (图5)。根据 Transwell 的迁移实验和侵袭实验,说明 GRHL3 过量表达促进 MCF7 细胞迁移和侵袭,且与 GRHL3 抑制 SNX16 表达有关。

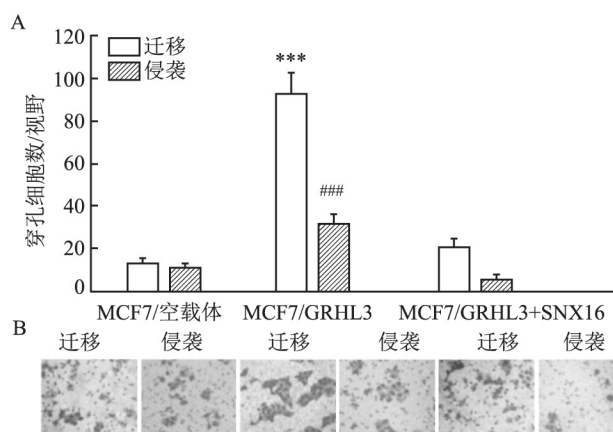


图5 MCF7 细胞迁移和侵袭

A: 细胞迁移和侵袭实验单个视野穿孔细胞数比较;与 MCF7/空载体、MCF7/GRHL3 + SNX16 比较: *** $P < 0.001$;与 MCF7/空载体、MCF7/GRHL3 + SNX16 比较: ### $P < 0.001$; B: 细胞迁移和侵袭实验单个视野穿孔细胞 $\times 20$

3 讨论

Grainyhead 家族高度保守,所编码的转录因子在胚胎发育过程中发挥关键的调控作用。GRHL3 是其中的成员之一^[1]。在小鼠发育过程中,GRHL3 在伤口愈合、表皮形成及胚胎神经管闭合等过程中发挥重要作用^[1-3]。GRHL3 不仅在正常生长发育过程发挥重要作用,同时参与肿瘤发生发展过程。既往研究^[7-8]表明,在早期乳腺癌中,尤其是非三阴乳腺癌中,GRHL3 表达量升高,其机制是细胞对称分裂和肿块形成之间存在密切联系。在果蝇和小鼠体内,GRHL3 调控多种参与表皮屏障形成及终末分化的基因表达^[9],近期研究^[10]报道,敲除小鼠体内角质层形成细胞中 GRHL3,可能诱发皮肤鳞癌的形成;基因表达谱分析显示 GRHL3 的表达与 E-cadherin 表达有抑制作用^[11];GRHL3 通过直接或间接结合 E-cadherin 启动子上,抑制 E-cadherin 的表达,促进上皮来源肿瘤细胞的迁移和侵袭^[11]。

为了探寻 GRHL3 调控与细胞迁移和侵袭的相关基因的表达,前期的染色质免疫共沉淀测序的结果发现 SNX16 可能是 GRHL3 调控的潜在靶基因(结果未示)。乳腺癌组织的免疫组织化学分析发现,GRHL3 高表达的肿瘤组织中 SNX16 的表达明显降低;提示 SNX16 可能受到 GRHL3 的负调控。

细胞水平研究进一步证实过量表达 GRHL3 时,SNX16 的表达水平显著降低。通过生物信息学分析发现,SNX16 基因启动子 DNA 序列存在 GRHL3 的潜在结合位点 TTTCC (T) 或 GGCT (A) GAGG,与前期研究^[5]发现的 GRHL3 结合 E-cadherin 基因启动子区域的特定序列 5'-CACCTG-3'或 5'-CAGGTG-3'均具有高度相似性。通过克隆 SNX16 基因启动子进行双荧光素酶实验,结果证实 GRHL3 对 SNX16 基因启动子的活性同样具有抑制作用,与 GRHL3 结合 E-cadherin 基因启动子抑制靶基因表达具有一致性。当对 SNX16 基因启动子区的 GRHL3 潜在结合位点进行突变,发现 GRHL3 无显著的抑制作用。因此 GRHL3 可能直接或间接通过结合于 SNX16 基因启动子,抑制 SNX16 表达。

以往研究^[11]证实 GRHL3 过量表达可以抑制 E-cadherin 基因表达,进而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭;SNX16 的过量表达可以促进 E-cadherin 的回收利用,而抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[6-9]。在低侵袭力乳腺癌细胞 MCF7 中过量表达 GRHL3,可以显著增加细胞的迁移和侵袭能力;当在过量表达 GRHL3 的细胞中转染 SNX16 cDNA 表达载体时,细胞的迁移和侵袭能力明显降低。因此,GRHL3 既能抑制 E-cadherin 的表达又能抑制 SNX16 的表达,进而影响细胞迁移和侵袭。GRHL3 作为核内转录因子,参与调控细胞迁移和侵袭的靶基因表达,进而改变细胞的迁移和侵袭能力。除了已经鉴定的 GRHL3 调控的靶基因 SNX16 和 E-cadherin 外,可能还参与调控其他靶基因的表达。发现和鉴定 GRHL3 调控的靶基因及其信号通路,从而探讨 GRHL3 在肿瘤细胞发生上皮-间质细胞转分化的核心转录因子 SNAIL、ZEB1 和 TWIST 等发生相互作用的方式^[12],为揭示 GRHL3 在肿瘤的迁移、侵袭和转移的分子机制具有重要的理论意义,也为干预肿瘤细胞的迁移和侵袭寻找新的治疗靶点具有应用价值。

参考文献

- [1] Wilanowski T, Treckfield A, Cerruti L, et al. A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to drosophila grainyhead[J]. Mech Dev. 2002, 114(1-2): 37-50.
- [2] Kudryavtseva E I, Sugihara T M, Wang N, et al. Identification and characterization of Grainyhead-like epithelial transactivator (GET-1), a novel mammalian Grainyhead-like factor [J]. Dev Dyn, 2003, 226(4): 604-17.

- [3] Yu Z, Lin K K, Bhandari A, et al. The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grhl3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4 [J]. *Dev Biol* 2006 299 (1): 126–36.
- [4] Caddy J, Wilanowski T, Darido C, et al. Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway [J]. *Dev Cell*, 2010, 19(1): 138–47.
- [5] Zhang L, Qin D, Hao C, et al. SNX16 negatively regulates the migration and tumorigenesis of MCF-7 cells [J]. *Cell Regen(Lond)*, 2013 2(1): 3.
- [6] 陈芳, 成芳, 项倩彤, 等. 肾小管上皮-间质细胞转分化模型的建立 [J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(6): 595–600.
- [7] Xu H, Liu C, Zhao Z, et al. Clinical implications of GRHL3 protein expression in breast cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(3): 1827–31.
- [8] Ting S B, Caddy J, Wilanowski T, et al. The epidermis of grhl3-null mice displays altered lipid processing and cellular hyperproliferation [J]. *Organogenesis* 2005 2(2): 33–5.
- [9] Xu J, Zhang L, Ye Y, et al. SNX16 regulates the recycling of E-cadherin through a unique mechanism of coordinated membrane and cargo binding [J]. *Structure* 2017 25(8): 1251–63.
- [10] De Castro S C, Leung K Y, Savery D, et al. Neural tube defects induced folate deficiency in mutant curly tail (GRHL3) embryos are associated with alteration in folate one-carbon metabolism but are unlikely to result from diminished methylation [J]. *Brith Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010 88(8): 612–8.
- [11] Zhao P, Guo S, Tu Z, et al. Grhl3 induces human epithelial tumor cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2016 48(3): 266–74.
- [12] Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions [J]. *Nucleic Acids Res* 2005 22(20): 6566–78.

GRHL3 promotes breast cancer cells migration and invasion via downregulation of SNX16

Zhou Lili^{1,2}, Zeng Fanjun¹, Tu Zhenzhen¹, et al

(¹*Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Key Laboratory of Permatology, Ministry of Education, Hefei 230032)*

Abstract Objective To investigate GRHL3 controlling SNX16 expression in breast cancer cells and promoting cell migration and invasion. **Methods** Immuno-histochemistry analysis was performed to detect GRHL3 and SNX16 expression in breast cancer tissues. Western blot was used to determine GRHL3 and SNX16 expression in the MCF7 cells overexpressed GRHL3. Luciferase reporter vectors with the wild type or the mutated promoter of SNX16 gene were established using molecular cloning technology. Luciferase assay was used to detect activity of the SNX16 promoter in presence of or absence of GRHL3. Transwell analysis was performed to investigate cell migration and cell invasion. **Results** Immunohistochemistry analysis showed that GRHL3 overexpressed in breast cancer tissues, whereas SNX16 expressed at lower level in breast cancer tissues than that in precancerous lesions. Western blot analysis showed GRHL3 overexpression inhibited SNX16 expression in MCF7 cells. Sequencing results proved that the luciferase reporter vectors with the wild type or the mutated promoter of SNX16 gene were successfully established. Luciferase assay showed GRHL3 dramatically inhibited activity of the SNX16 promoter. Transwell analysis indicated GRHL3 promoted MCF7 cells migration and invasion partly related to downregulation expression of SNX16. **Conclusion** GRHL3 promotes migration and invasion of breast cancer cells via downregulation of SNX16 expression.

Key words GRHL3; SNX16; breast cancer; migration; invasion